

SURFACE-STRENGTHENING RAMAN SPECTRUM IMMUNOASSAY

Publication number: JP6174723 (A)

Publication date: 1994-06-24

Inventor(s): PIITAA JIEI TAASHIYA; TOOMASU II ROA; JIEIMUSU JIEI
MAAKASU; TEREZE KOTSUTON; BAANAADO
ROSUPENDOUSUKI +

Applicant(s): ABBOTT LAB +

Classification:

- international: G01N21/65; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/543;
G01N21/63; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/543; (IPC1-
7): G01N33/533; G01N33/543

- European: G01N21/65D; G01N33/543K2

Application number: JP19930226084 19930910

Priority number(s): US19920944138 19920911

Also published as:

JP3444630 (B2)
EP0587008 (A1)
EP0587008 (B1)
GR3029912 (T3)
ES2129474 (T3)
DK587008 (T3)
DE69323459 (T2)
CA2105782 (A1)
AU4625993 (A)
AT176727 (T)

<< less

Abstract of JP 6174723 (A)

PURPOSE: To provide a method, a composition, a device an apparatus and a kit for determining the presence and the quantity of an analyte by observing an analyte-medium ligand bonding event in a test mixture containing an analyte to be assayed, and particles having a specific bonding position, a Raman active label and a surface inducing surface-enhanced Raman scattering. **CONSTITUTION:** A test mixture is irradiated with a radiation energy sufficient for emitting Raman spectrum being detected by a Raman-active label in the test mixture. The difference of detected surface-enhanced Raman scattering spectrum depends on the quantity of analyte existing in the test mixture. Consequently, the presence and the quantity of analyte can be determined by observing the difference.

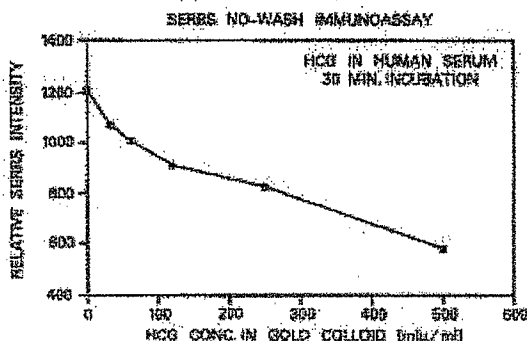


FIG. 9

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(51)Int.Cl. ⁴	G 0 1 N	33/533	33/543	E 9217-2 J	F I	技術表示箇所
識別記号	庁内整理番号	8310-2 J				
(21)出願番号	特願平5-226064	(71)出願人	39108788	審査請求 未請求 請求項の枚数(全 21 頁)		
(22)出願日	平成5年(1993) 9月10日	アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国80064-3500イリノイ州ア ボット・パーク、ラン・アボット・パー ク・ロード (普通の特示なし)				
(31)優先権主張番号	9 4 4 1 3 8	(72)発明者				
(32)優先日	1992年9月11日	アメリカ合衆国、イリノイ・80046、レイ ク・ピエラ、ジェラデン・ロード・21651				
(33)優先権主張国	米国 (U S)	(72)発明者				
		アメリカ合衆国、イリノイ・80083、ガー ニエ、フアン・デアル・ロード・986				
		(74)代理人				
		弁理士 川口 義雄 (外2名)				
		最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 表面強化ラマンスペクトロームアッセイ

(57)【要約】

【目的】アッセイすべき被分析物質、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を有する粒子を含む試験混合物中、被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、被分析物質の存在または量を検出するための方法、組成物、デバイス、装置及びキットを提供する。

【構成】本試験混合物に、試験混合物中のラマン-活性標識が検出可能なラマンベクトルを放出するのに十分な放射エネルギーを照射する、検出した表面-強化ラマン散乱ベクトルに於ける違いは、試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する。したがって、これらの違いを相対することにより、被分析物質の存在または量が測定できる。

1

(2)

特開平6-174723
2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出する方法であって、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識並びに、被分析物質、もしくは特定の結合部位、ラマン-活性標識及び粒子の会合により顕微鏡が形成される表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を有する粒子を含む試験混合物を形成し、顕微鏡中、ラマン-活性標識が検出可能なラマンベクトルを生むのに十分な放射エネルギーを試験混合物に照射し、次いで試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する、検出した表面-強化ラマン散乱ベクトルに於ける違いを観測することを含む該方法。

【請求項2】 ラマン-活性標識が特異的な結合部位にあることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ラマン-活性標識が粒子にあることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】 特異的な結合部位が粒子にあることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】 標識化特異的結合部位が粒子にあることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項6】 特異的な結合部位が標識化粒子にあることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項7】 特異的な結合部位が、特異的な結合部位及び被分析物質からなる第1の特異的結合対の一方であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項8】 ラマン-活性標識が特異的結合部位と粒子の両方にあることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】 試験混合物がさらに第2の特異的結合部位を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】 第2の特異的結合部位が、特異的結合部位と被分析物質からなる第1の特異的結合対の一方であることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】 第2の特異的な結合部位が、第2の特異的な結合部位と被分析物質からなる第2の特異的な結合対の一方であり、第2の特異的な結合部位は第1の特異的な結合部位と異なることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項12】 第2の特異的な結合部位が表面強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を有する第2の粒子にあることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項13】 第1及び第2の粒子が同一物質からなることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 照射エネルギーにより表面強化共鳴ラマン散乱が起きることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項15】 さらにエンハンサーを錯体に添加することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項16】 試験混合物中の被分析物質-媒介リガ

ンド結合事象を観測することにより、体積から誘導した試験サンプル中の被分析物質の存在または量の測定法であって、試験サンプル、特異的結合部位により認識される被分析物質エントロピーを有する被分析物質-類似体を含み、媒介分子を介して直接または間接的にラマン-活性標識となつていて直接または間接的にラマン-活性標識が形成される表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を有する粒子と被合一した特異的結合部位を含む試料溶液を含む試験混合物を形成し、粒子上の特異的結合部位に対する標識化被分析物質-類似体の結合の程度が、被分析物質の存在により影響されるように、標識化被分析物質-類似体を粒子上の特異的結合部位に結合させ、試験混合物中の結合した標識化被分析物質-類似体上のラマン-活性標識が検出可能なラマンベクトルを生ずるのに十分な放射エネルギーを試験混合物に照射し、次いで試験混合物中に存在する被分析物質に依存する、検出した表面-強化ラマン散乱ベクトルの違いを観測することを含む該方法。

【請求項17】 多孔性物質による、ラマン-活性標識に会合した粒子の分離段階をさらに含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】 放射エネルギーにより表面-強化共鳴ラマン散乱が起きることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項19】 さらに試験混合物にエンハンサーを添加することを含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項20】 試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出する方法であって、被分析物質-類似体、表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を持つ、ラマン-活性標識に会合した粒子に被合一した特異的結合部位を含む粒状捕獲試薬を含む試験サンプルから試験混合物を形成し、試験混合物を、被分析物質-類似体に結合し得、捕獲部位に固定化された捕獲試薬を含み、近位配位領域を持つクローララフマー物質上に載置し、キャビタリウム作用により近位端から遠位端へむかつて試験混合物を動かす、検出可能なラマンベクトルを生ずるのに十分な放射エネルギーを捕獲部位に照射し、次いで試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する、表面-強化ラマン散乱ベクトル中の違いを観測することを含む該方法。

30

【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘導し得る表面

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘導し得る表面

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘導し得る表面

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘導し得る表面

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試験混合物中の被分析物質-媒介リガンド結合事象を観測することにより、試験混合物中の被分析物質の存在または量を検出するための新規方法、組成物及びキットに関する。特に、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び表面強化 (enhanced) ラマン散乱を誘導し得る表面

を有する粒子を含む試験混合物中での、表面一酸化ラ
ンゲルズベクトルの違い及び変化を制御することによ
り、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出
するための新規方法、組成物及びキットに関する。【
00022】特定の分子（結合分子と称する）による他
の特異的分子（リガンドと称する）に対して示される結
合親和性は、サンプル中の特定の結合分子またはリガ
ンドの量を測定するためのアッセイの基礎として通常利
用される。

【00033】結合分子-リガンド組体を形成する際に関
与する2個の分子は、特異的結合対とも称される。特異
的結合対の一方は、特異的結合部位と称される。本発明
は、検出方法として表面一酸化ランゲルズベクトルによ
って、結合分子及びリガンドの特異的結合対を使用するアッセ
イを実施するための方法を包含する。本例は、アッセ
イを実施するために使用する物質及びキットも包含する。
【00044】アッセイとは、（1）サンプル中の物質の
存在を検出するため、（2）サンプル中の物質を同定す
るため、及び/または（3）サンプル中の物質の量を測
定するための方法である。当業界の専門用語では、検
出、同定または定量するためにアッセイ対象となる物質
を「被分析物質」analyte）と呼称する。

【00051】リガンド結合アッセイは、医療診断に特に
重要である。近代の診療に於いて、リガンド結合アッセ
イは、抗体、抗原、ホルモン、投薬、毒物（poison
s）、毒素（toxins）、違法薬（illegal drug）等の存
在を検出するために、患者の血液、尿、唾液等で日常的
に実施される。

【00066】新規の、良好な、それが高価でなく且つ迅
速なアッセイは、ヘルスケアのレベルを向上し得る。こ
のようなアッセイは、患者に関してより多く且つより優
れた情報を患者に提供することができ且つ穏当なコスト
で実施し得る。さらに、アッセイをより容易且つより安
価にすることがにより、高レベルのヘルスケアを世界の発
展途上地域に伸張し得る。リガンド結合アッセイは、食
品、工業的生物学的方法及び生物学的研究の多くの領域
に於いて、地下水の汚染、毒素及び殺虫剤をモニターす
るのにも使用される。

【00077】
【特許の技術】多くのアッセイでは、微量の特定の物質
（被分析物質）を、非常に多量の他の物質の存在下で検
出且つ測定しなければならぬ。このようなことは、結
合分子がリガンドに対して親和性が低く、他の物質の存
在に遮蔽なく、その特定のリガンドに関して高度の結合
特異性が得られるため可能となる。最も一般的なリガ
ンド結合アッセイは、イムノアッセイである。

【00088】イムノアッセイとして働く結合分子となり、
これにより特異的な結合対を形成する。抗体/抗原結合
量を測定するためには、特異的な結合対の一方を追跡可

能な物質で印をつけ、即ち標識化する。追跡可能な物質
の特異的な性質によって、検出または測定すべきその存
在、即ち、これに結合する特異的な結合部位の存在を検
出または測定される。特異的な結合対の標識化部分は、指
示薬と呼称される。

【00099】直接イムノアッセイでは、特定の結合対の
他方に結合した指示薬の量を測定する。間接イムノアッ
セイでは、被分析物質の存在、特異的結合対の他に対
する指示薬の結合の割合を測定する。

【00101】特異的結合対のそれぞれは、抗原または抗
体でなくてもよい。しかしながら、互いに親和性を有す
る任意の2個の分子は、特異的結合対を含み得、リガ
ンド-結合アッセイの基礎を形成し得る。このような特異
的結合対の他の例としては、レクチン及びそれらが結合
する板金被覆化物、ホルモン及びそのレセプター、任意
のエンザイム-分子及びそのレセプター、他の分子に特
異的に結合するように分子構造設定され且つ合成された
結合分子及び共通の親和性を有する他の分子（例えば、
アミノ酸及びピオチン）が挙げられる。

【00111】2種類の一般的に使用されるイムノアッセ
イ方法としては、ラジオイムノアッセイ（RIA）及び酵
素イムノアッセイ（EIA）があり、いずれも指示薬とし
て標識化特異的結合部位を使用する。RIAでは、特異的
結合部位に結合する追跡可能な物質として放射性同位体
を使用する。放射性同位体は非常に少量でも検出可能な
ので、少量の被分析物質を検出または定量することが使
用し得る。しかしながら、RIAは実質的に多くの欠点か
がある。これらの欠点としては、放射性物質の取り扱い
時に必要特別な装置及び極度の注意、このような極端な
試験並びにその特別な廃棄条件が挙げられる。

【00121】EIAでは、その基質が存在する場合、検出
可能な物質またはシグナルをもたらす特異的な結合部位
に結合する標識として酵素を使用する。この酵素-標識
化特異的結合部位は指示薬として働き、その結合を検出
するのに酵素活性を利用する。EIAはRIAが持つ欠点の
幾つかがないが、EIA方法は、検出可能な酵素反応を誘
発するために基質物質を追加しなければならぬ。他の
欠点としては、酵素安定性及び基質変異（lunover）速
度は温度感受性であり、温度が上昇するにつれて酵素安
定性は低下し、基質変異速度は増加する点が挙げられ
る。

【00133】これらのアッセイ構成（configuration）
の総てに共通の欠点は、被分析物質に結合するものと未
結合標識化試薬とを分離しなければならぬということ
である。これは通常、アッセイを手動で実施するときに
は冗長な洗浄段階が必要で且つ自動化形式ではみづか
たロボット工学が必要である。

【00141】イムノアッセイは、自動化装置によっても
実施し得る。このような装置の例としては、本出願にか
ら市販されているTmx（特許）、Ihx（特許）及びIhx SE

LECT（登録特許）アナライザーが挙げられる。これらの
装置を使用し、体液（例えば、血液、血漿及び全血）
に於いて被分析物質濃度を測定する。Ihx（特許）及びI
hx SELECT（登録特許）アナライザーは、Charles H. Kei
ler, "The Abbott Ihx（特許）及びIhx SELECT（登録
商標）システム", J. Clin. Immunossay, 14, 115, 1991;
並びにK. Flore, "The Abbott Ihx（登録特許）自動
化ベントリブ免疫化学アナライザーシステム", J. Clin. Ch
em., 34, 1176, 1986に記載されている。

【00151】他の型のアッセイでは、所謂「試験片」及
び「フロースルー」方法を使用する。これらの方法を使
用して、試験サンプルを「試験片」または「フロースルー」
装置に適用し、被分析物質の存在は、着色反応によ
り発生した親和的に検出可能なシグナルにより表す。フ
ロースルー装置は通常、その上に所を形成したか、また
はその中に含まれるマイクロツクス上の捕獲部位で固定化
された試薬の付いた多孔性物質を使用する。試験サンプ
ルの被分析物質は、試薬と反応して多孔性物質上に検出
可能なシグナルを発生する。このような装置は、被分析
物質の存在を定量的に検出するのに有用であることが証
明された。

【00166】近年、金属コロイド粒子を使用するアッセ
イ方法が開発された。標識すべき特異的結合部分を、吸
着により金属またはコロイド粒子上に被覆し、金属粒子
を標識とする。免疫反応によって固体支持体上にこれらの
の標識化結合部位を局在化することにより、親和的に検
出可能で且つ装置によって測定可能なシグナルを形成し
得る。

【00177】蛍光及び可相染料及びスピン標識も、リガ
ンド結合アッセイで標識として使用されている。

【00188】これらの結合分子-リガンドアッセイは総
て、各々欠点を有する。標識化特異的結合部位の存在を
検出または測定する手段としてラマン光散散を使用する
と、以下に記載するようにこれらの欠点の幾つかを避け
られる。

【00199】レイズ光分散
従来より、特定の分子が、光ビーム（例えば、紫外、可
視または近赤外）によって照射されると、入射光量子の
小画分は幾つかのエネルギー準位で電子の基底状態より
も高い振動準位に遷移することは公知であった。これ
らの高い振動準位は、坂の状態と呼称される。殆どの場
合、これらは弾性衝突であり、分子は光量子を放出する
ことによりその元の振動準位に戻る。光量子は入射光と
同一波長で全方向に放射（即ち、散乱）する。これをし
イ-ラ散乱と呼ぶ。

【00202】ラマン光散乱
1928年、C. V. Ramanは、特定の分子に照射すると、光量
子を保持した分子のうちの少部分が、保持した光量子を

放出した後も元の振動準位に戻らず、電子の基底状態の
異なる振動準位に落ちることを示した。従って、これ
らの分子から放出された放射エネルギーは、異なるエ
ネルギー-且つ異なる波長にある。これをラマン散乱と呼
称する。

【00211】分子が電子の基底状態の高い振動準位に落
ちると、放出された光量子は、吸収したところより低
いエネルギー-即ち長波長にある。これは反ストークス
フローランゲルズベクトルと呼ばれる。分子が光子を吸収する
前に既に高い振動準位にあるとき、放出された光量子に
この通常のエネルギーを付与し得るので、基底状態に戻
る。この増え、放出されたエネルギーは、高エネルギー
（且つ短波長）であり、反ストークスフローランゲルズ
ベクトルと呼ばれる。通常条件下、任意のセットの分子に於
いて、基底状態の分子数は、常に励起状態の分子よりも
かなり多いので、励起分子と相互作用し且つ衝突時に持
っていた以上のエネルギーをもって散乱した光量子の確
率（odds）は非常に小さい。従って、入射光量よりも
高い波長で散乱する光量子（反ストークス波長）は、入
射光量子よりも低い波長で散乱する光量子（ストークス
波長）に対して少ない。従って、通常分析されるのはス
トークス波長である。

【00222】このようにして分子に対して損失したエネ
ルギー、即ちそれから得られたエネルギー量を量化する
と、不連続的な波長シフトを持つ分散した光量子が得
れる。これらの波長シフトは、分子に比例した形で得
る。ラマン散乱は、特定の分子を識別するための分析
手法及び、分子構造を研究する手段として有用であると
考えられる。しかしながら、他の方法、例えば、赤外分
析法とはではない。

【00233】共鳴ラマン散乱
ラマン分光法に於ける重要な性質は、光源としてレーザ-を
使用することにより更新された。その強力な干渉光は、
ラマン分光法の最良の欠点を克服した。さら
に、入射光の波長が分子の最大吸収波長またはその近く
であると、分子内に電子並びに振動遷移が生じ、共鳴ラ
マン散乱を観察し得ることが見知された。共鳴ラマン散
乱を使用すると、再放出された光量子は、ラマン散乱に
付随した振動エネルギーに違いを示す。しかしながら、
共鳴ラマン散乱を使用すると、電子振動吸収は約1000倍
も効率が高くなる。共鳴ラマン散乱からの増強シグナル
を使用しても、分析手法としてのその有用性は、まだ比
較的に強いシグナルのため限定されていた。しかしなが
ら、近年、表面増強効果が発見され、ラマン散乱強度を
さらに飛躍的に増強する手段が提供された。

【00244】表面増強ラマン散乱
分子を特定の金属表面に非常に近接（しかし、必ずしも
接触しない）させると、ラマン光散乱の強度が非常に増
加することが知られている。金は表面は、微細な金粒子
で「荒くする」roughened）か、または膜厚いなければ

50

ならない。金属コロイドも、このシグナル増強効果を示す。増強は数10倍以上のオーダーに増加し得る。1974年、Dr. Richard P. Van Dyke等、この効果を特徴的な現象として最初に認識し、「表面強化ラマン散乱」(SERS)という用語を作り出した。

【0025】SERS効果の理由は完全には理解されていない。しかしながら、現在、少なくとも2つの別個の事実がSERSに寄与すると考えられている。第1に、金属表面は極薄な皮で被覆されている。第1に、金属表面はコロイドに於いては、同相樹洞体であるかそれに近い)として考えられる。入射光の波長の約1/10の直径のこれらの粒子が、最も効果的であると考えられる。入射光子は、金属の、非常に移動性電子を持つ粒子を介して電場を誘導する。

【0026】金属表面または粒子特定の形状に於いては、表面電子群は、印加された(applied) 振動電磁場に対して集合状態(collective fashion)で振動するようになつてし得る。このような集合的振動電子群は、「プラズモン(plasmon)」と呼ばれる。入射光子量は、この振動電磁場を供給する。入射光による分子中の振動双極子モーメントの誘導は、ラマン散乱源である。表面プラズモンの共振振動効果は、金属表面の近傍に於ける電磁場強度を大きく増加させる。これにより双極子の振動が増加して、分子の分散を誘発し、ラマン散乱光の強度が増加する。この効果により、粒子近傍の入射光の強度も見掛け上増加する。

【0027】SERS効果に寄与すると考えられる第2の因子は、分子イメージングである。金属表面に非常に近接した双極子モーメントを持つ分子は、反対の極性(即ち、プラスモン上の影双極子)の表面上にそのイメージ力を増加させて光を散乱させると考えられる。他方、表面プラズモンに対して誘導または至んだ双極子モーメントを持つ分子のこのカッパノビは、励起の確率を非常に高める。この結果、表面-吸収分子により散乱されたラマン光の効果が非常に高まる。

【0028】SERS効果は、表面ラマン効果と組み合わせることにより強化し得る。表面強化ラマン散乱効果は、励起の波長が放射される分子の主要吸収帯と共鳴すると、より強力になる。得られた表面強化共鳴ラマン散乱(Surface Enhanced Resonance Raman Scattering: SERS)効果は、7桁以上大きいラマン散乱シグナル強度に強化し得る。

【0029】 α -ムフツセイへのSERSの適用 SERS効果は、分子表面構造及び動力学を研究するために、物理及び分析化学者により用いられて電極表面上で化学反応を促進する。近年、ラマン-活性離れ分子団(prosthetic groups) (例えば、ヘム)を含む生物学的分子にも適用されている。

【0030】今日まで、免疫診断に対してはSERS法は適

用されなかつた。

【0031】免疫診断に於いてこの方法を使用すると、幾つかの特定の長さ所が得られる。SERS活性表面は表面の近接集合に強く依存するので、SERS活性表面上または近くで固定化したこれらのリポーター分子の強いシグナルに寄与し、溶液中に残ったシグナルの寄与は無視し得る。異なる環境または異なる配向で結合した分子は、異なるラマン分散特性を示し得る。

【0032】

【説明の概要】 本発明の一態様によれば、試験混合物中、被分析物質、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び、表面-強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つこととを特徴とする粒子の間に錯体を形成させることにより、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び粒子を含む試験混合物中の被分析物質(媒介)リガンド結合事象を制御し；錯体中のラマン-活性標識に検出可能なラマンスペクトルを生むのに十分な放射エネルギーを試験混合物に照射し；次いで、測定した表面-強化ラマン分散スペクトル中の、試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する違いを観測することにより被分析物質の存在または量をアッセイまたは測定する方法を提供する。

【0033】本発明のもう一つの態様では、試験サンプル、特異的結合部位により識別される被分析物質エピソードを誘導する被分析物質-類似分子を含み、媒介分子を介して直接または間接的にラマン-活性標識に結合する被分析物質-類似分子を含む被分析物質-類似体であって、粒子上の特定の結合部位に標識化被分析物質-類似体の結合量は被分析物質の存在により影響される、標識化被分析物質-類似体、及び表面-強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つ粒子上に固定化された特異的結合部位を含む粒状補獲試薬を含む試験混合物を形成することにより、試験混合物中の被分析物質-媒介)リガンド結合事象を観測し；次いで試験混合物中の結合した標識化被分析物質-類似体上のラマン-活性標識に検出可能なラマンスペクトルを生むのに十分な放射エネルギーを試験混合物に照射し；次いで、試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する、検出した表面-強化ラマン分散スペクトルに於ける違いを観測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量をアッセイまたは測定する方法を提供する。

【0034】本発明のもう一つの態様では、試験混合物中の被分析物質-媒介)リガンド結合事象を制御することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量をアッセイまたは測定するための方法であって、表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面及び、ラマン-活性標識も有する粒状に結合した特異的結合部位を含む粒子状補獲試薬と被分析物質を含む試験混合物に結合し得且つ補獲部位物を形成し；次いで被分析物質に結合し得且つ補獲部位

に固定化された補獲試薬を含む、近接増強及び遠位増強を持つフローティングイオン物質上に試験混合物を吸着し；次いでキャッチャー作用により近位増強と遠位増強-試験混合物を移動させ；次いで検出可能なラマンスペクトルを生むのに十分な放射エネルギーを補獲部位に照射し；次いで試験混合物中に存在する被分析物質の量に依存する、検出した表面-強化ラマン分散スペクトルに於ける違いを観測する該方法を提供する。

【0035】本発明のさらにもう一つの態様では、表面-強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つ且つラマン-活性標識で標識した粒子を含む、試験混合物中の被分析物質-媒介)リガンド結合事象を観測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を測定するために使用するべき組成物を提供する。

【0036】本発明のもう一つの態様では、試験混合物中の被分析物質-媒介)リガンド結合事象を観測することにより、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を測定するためのキットであって、ラマン-活性標識；表面-強化ラマン光散乱を誘発し得る表面を持つ粒子；及び被分析物質用の特異的結合部位を含むキットを提供する。

【0037】

【好ましい態様の説明】 上記の如く、本発明は、試験サンプル、特異的結合部位、ラマン-活性標識及び、表面-強化ラマン光散乱を誘導し得る表面を持つ粒子を含む、試験混合物の表面-強化ラマン分散スペクトルに於ける違い及び変化を観測することによる、試験サンプル中の被分析物質の存在または量を検出するためのアッセイ方法、組成物及びキットを包含する。分散した粒子状混合物中に被分析物質が存在すると、混合物から得られるラマンスペクトルに影響すると考えられる。

【0038】本発明の種々の態様の記載に進む前に、多くの用語を定義する。

【0039】定義 本明細書中で使用する「被分析物質: analyte」という川出は、本発明によって試験サンプル中で検出される物質である。被分析物質は、天然に存在する特異的結合部位(例えば、抗体)または特異的結合部位を製造して任意の物質であり得、被分析物質はアッセイ中で1つ以上の特異的結合部位と結合し得る。「被分析物質」は、任意の被分析物質、リポテン、抗体及びそれらを含む、含む、被分析物質としては、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、診療目的で投与したもの並びに違法目的(illicit purpose)で投与したものを含む薬剤、微生物、ウイルス及び上記任意物質に対する抗体または代謝物質を含み得る。

【0040】本明細書中で使用する「被分析物質-類似体」という用語は、被分析物質の特異的結合部位と交差反応する物質を意味する。被分析物質に比しての交差反応性は大きくてもよい。被分析物質-類似体は、

被分析物質類似体が当該類似体と共通の少なくとも1つのエピソード部位を持つ限り、改質被分析物並びに被分析物質分子のラマンメント化または合成部分を含み得る。

【0041】本明細書中で使用する「被分析物質エピソード」という用語は、特異的結合事象時に、特異的リガンド結合対の一方と接触する被分析物質のエピソードと接触する特異的結合事象時に被分析物質のエピソードと接触する特異的結合対の一方のその部分は、「パントリー: pantry」と呼ばれる。

【0042】本明細書中で使用する「被分析物質-媒介)リガンド結合事象」という用語は、結合量が被分析物質の存在及び量により影響される、特異的リガンド結合対の双方間の特異的結合事象を指す。この影響は通常、被分析物質が補強、または精造と似ているか、エピソード、若しくは特異的リガンド結合対の一方により含まれるエピソードを含むため、特異的結合事象で特異的リガンド結合対の他方によりその識別がなされる。結果として、被分析物質は、特に特異的リガンド結合対の一方に結合し、これにより、特異的リガンド結合対の他方に結合することとなる。

【0043】本明細書中で使用する「補助的(なり)結合部位」という用語は、補獲試薬及び指示薬の特異的結合以外に使用される特異的結合部位であり、最終結合体の一部となる。1つ以上の補助的な特異的結合部位は、アッセイで使用する。例えば、補助的な特異的結合部位は、指示薬の補助的な特異的結合部位に結合し、引き続き被分析物質に結合し得るアッセイで使用する。

【0044】「凝集: aggregation」は、液体中に懸濁した粒子が固まりに集まる反応を意味する。

【0045】本明細書中で使用する「会合した: associated」とは、2個以上の分子及び/または粒子の状態が互いに近接保持されている事を意味する。

【0046】本明細書中で使用する「補獲試薬: capturing reagent」とは、実質的に10体の物質に、1つまたは1つ以上の特定の結合部位である。固相補獲試薬類似体は、アッセイの結合及び非結合成分を分離するために使用し得る。

【0047】本明細書中で使用する「接合体: conjugate」とは、一方の部分と他方が化学結合することにより形成した物質を指す。このような種の例としては、ラマン血清アルブミンと化学的に活性化したデオキシリボ糖の反応生成物及び、化学的に活性化したラマン-活性標識と、蛋白質分子(例えば、抗体)またはリガンド(例えば、デオキシ)との反応生成物が挙げられる。

【0048】本明細書中で使用する「エンハンサー: enhancer」とは、試験混合物中に存在する、溶液または懸濁液中の粒子または生物性物質の中の凝合(liquid g) 、会合(association) または凝集を助ける任意の物

質である。エソハンスーは、液体媒質の阻、イオン性、溶媒または凝集特性を変化させることによってまたは他の機構により作用する。エソハンスーの例としては；塩、例えば、塩化ナトリウム；所望の阻を保持するために、無、任意の型の緩衝液；糖；及びポリマー、例えば、ポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】本明細書中で使用する「指示薬」は、特異的結合部位または金属表面上に被または阻格的についた検出可能な構造を含む。

【0050】本明細書中で使用する「媒介分子：interacting molecule」とは、特異的結合部位及びラマン活性構造の両方がついている任意の物質である。

【0051】本明細書中で使用する「粒子」とは、液体中に分散可能で、11つ表面一強化ラマン光散乱 (SERS) または表面一強化共鳴ラマン光散乱 (SERS) の現象を支持する任意の物質である。粒子の例としては、金若しくは銀のコロイド；金、銀、銅、若しくは伝導帯電子 (Conductance band electrons) を示す任意の物質の粒子またはフレークが挙げられるが、これらに限定されない。粒子表面はSERS及びSERS効果と関連するので、伝導帯のフレークまたは粒子も好適な粒子となる。

【0052】本明細書中で使用する「照射エネルギー：radiation」という用語は、試験混合物に適用すると、その中のラマン一活性構造によりラマンシフトを発生させ、且つ粒子表面と会合した金属表面もラマン一活性構造により表面一強化ラマン光散乱させる、電磁波の形のエネルギーである。

【0053】本明細書中で使用する「ラマン一活性構造」という用語は、適当な波長の放射エネルギーを照射すると、存在する他の成分のラマンシフトと識別可能で検出可能なラマンシフトを出す任意の物質を指す。ラマン一活性構造の他の用語としては、染料及びリポーター分子を含む。

【0054】SERS活性表面で吸光がレーザー励起波長と共振状態にあるとき、「SERS (表面強化共鳴ラマン散乱) 」が起きる。共鳴及び表面強化の結果、散乱が強化される。

【0055】「SERS (表面一強化ラマン散乱) 」は、特定の金属表面の近隣の特定の分子により示されるラマン散乱に於ける増加を意味する。

【0056】本明細書中で使用する「特異的結合部位 (specific binding member) 」とは、特異的結合の一例、即ち、分子の一方が、化学的または物理的手段により第2の分子に特異的に結合する他の異なる分子である。抗原及び抗体一特異的結合対以外に、他の特異的結合対としては、デオキシ及びアデニン、尿水化合物及びレウチン、相補的ヌクレオチド配列 (ターゲット核酸配列) を検出するためのDNA/ペプチド/イオン交換一ジョイント

イで使用するフローアツと捕獲された核酸配列を含む)、相補的ペプチド配列、エフェクター及びシグナル分子、酵素補因子及び酵素、酵素阻害剤及び酵素が挙げられる。さらに、特異的結合対としては、元の特異的結合部位の類似体であるものも含み得る。例えば、被分析物質の誘導体またはフラグメント、即ち、被分析物質一類似体は、被分析物質と共通の少なくとも1個のエピトープを持つ限り使用し得る。免疫反応性特異的結合部位としては、抗原、ハプテン、抗体及びその副体 (相換え阻害またはペプチド合成により形成したものを含む) が挙げられる。

【0057】本明細書中で使用する「安定剤」とは、添加剤として、懸濁液中では粒子が会合する傾向を下げるように働く粒子 (コロイドを含む) と一緒に使用する物質である。安定剤の典型例としては、Tween 20, Brij 35, Triton X 100, ポリエチレングリコール及びラジカル清アルミニウムが挙げられる。

【0058】本明細書中で使用する「試験混合物」とは、試験サンプル中の被分析物質を検出するために本発明に適用するために使用する試験サンプルと他の物質との混合物を指す。これらの物質の例としては、特異的結合部位、相補的な結合部位、被分析物質一類似体、ラマン一活性構造、緩衝液、希釈液及び表面一活性ラマンシフトを生じ得る表面を持つ粒子等が挙げられる。

【0059】本明細書中で使用する「試験サンプル」とは、本発明を用いて検出及びアッセイする被分析物質を含むサンプルを指す。試験サンプルは被分析物質以外に他の成分を含み得る、液体、または同様の物理的性質を持ち得、任意の大きさまたは容積 (例えば、液体の移動流を含む) であり得る。試験サンプルは、他の物質が特異的結合部位の特異的結合または被分析物質若しくは被分析物質一類似体を干渉しない限り、被分析物質以外の任意の物質を含み得る。試験サンプルの例としては、血液、血液、唾液、精液、尿、他の体液及び細胞サンプル、例えば、地下水若しくは汚水、土壌抽出物及び殺虫剤残骸を含むが、これらに限定されない。

【0060】 監造

DMB、2-[4-ヒドロキシフェニルアゾ]安息香酸、
DAB、p-ジメチルアミノアゾベンゼン、
HSH、ヒト甲状腺刺激ホルモン、
PBS、リン酸塩で緩衝させた生理浸透液、
BSA、ウシ血清アルブミン、
TMSA、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸、
DAB-TTC、4-ジメチルアミノアゾベンゼン-オ-イソチオシアナート、
DMF、ジメチルホルムアミド、
IL、国際単位、
デオキナー-BSA-DAB、デオキシ化ラジカル血漿アルブミンと4-ジメチルアミノアゾベンゼン-オ-イソチオシアナート

トとの複合体、
DMF ジニトロフェニル、
DMF-BSA ジニトロフェニル血漿アルブミン、
DMF ジニトロベンゼン、
もう一つの好ましい選定

1. 表面

多くの金属物質及び形態を、SERS活性表面のために使用し得る。これらの物質 (例えば、銀、金、銅、パラチナ等) は、平坦な表面 (片、スリッパ、スライド等) 若しくは粒子 (例えば、分散したコロイド、粒子、溶液、即ち水銀)、フレーク、または他の比較的小さい個々の構造体とするか、あるいはシリカ、ガラスチップ、ガラス、銅若しくは巨視的には平坦若しくは織 (textured) 構造 (鋭利した、腐食させた、凹みをつけた若しくは成形した) 片、スライド、スリッパ片若しくは球体などの他の物質、または上記のラマン散乱の表面強化を支持するように活性物質 (例えば、銀、金) で被覆した繊維の形であつてもよい、金属のための不活性支持構造体の形状を取り得た、強化できる表面または側は、特異的な結合部位がついた別の1種の物質 (シリカ、ガラスチップ、酸化物など) で被覆し得る。

【0061】光励起可能な表面パラズミンの存在は、通常、表面増強に必要であると考えられる。表面に強力なSERS効果を与えるためには、その表面パラズミンは、その内在エネルギーが散乱しないように向位化しなければならぬ。これは、導電性金属 (通常、銀または金) を小さな粒子に分割することにより達成し得る。実際には、金属の固体片の表面を電気化学的に「粗面化」し得る。以下の例例に示すように、銀粒子は、溶媒から支持体に沈積し得るか、銅は、蒸着若しくはバンプコーティングにより支持体上に沈積し得る。銀被覆したシリカ格子 (grating) は、銀若しくは銅で荒くし、または球体を被覆し、次いで銀で被覆した銀被覆表面と同様に強いSERS強化が可能である。

【0062】本発明に特に合致したSER (R) スペースのアッセイに例示のよい表面は、金属コロイド形の粒子である。金属コロイドは、非常に強力なSER (R) S活性と、容易に取り扱ひ得る液体媒質の長所を持ち合わせている。SER (R) Sの試験とコロイド試験を組み合わせた、現在の臨床化学分析で使用するのと同様の方法でアッセイを実行することができ。

【0063】本発明で使用する金属コロイドは、元素状の銀または金から構成されているが、これらの金属に限定されない。例えば、銅やその他の金属から構成されているコロイドも、SERS及びSERS効果を提供することが公知である。金属の分散液は、所与の金属希釈塩溶液を還元することにより製造し得る。種々の還元剤、例えば、アスコルベート、シトレート、水素化ホウ素または水素ガスを使用し得る。製造法は、得られたSERSまたはSERSサンプルの様相及び強度に影響し得る。しかし

ながら、これは本発明を限定する因子ではない、従つて、'実施例20は、シトレート還元及び水素ガス還元により製造したコロイドの別個のサンプルに吸着させた2種類のラマン一活性構造、即ち染料メチレンブルー及びオキシサフレン25の20:1混合物のSERSサンプルによりは、粒子及びサンプルが異なつていても使用し得ることを示している。

【0064】通常、これらの還元法で製造したコロイドは、特に、還元剤を除去するか、還元剤が低減したある場合、還元剤及びその酸化副生成物、特に酸化金属二オキシ由来のラジカルに由来する負に帯電した表面を持つている。これらの場合にコロイドの安定化の詳細は、Paul C. Hiemenz, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Marcel Dekker, 1977, 第9〜11章に適切に記載されている。懸濁液中のコロイド粒子の安定化の他の機構は、立体安定化 (steric stabilization) と呼ばれている。立体安定化は、安定化部分が帯電してないという点で静電的安定化 (electrostatic stabilization) とは区別される。これらの部分は、殆ど通常、本質的にポリマー性であり、分散液の連続 (即ち、溶媒) に少なくとも一部が相容可能であるまたは溶解性である。この場合、「ポリマー性」という用語は、合成ポリマー分子 (例えば、ポリスチレン若しくはポリエチレンオキシド) 、または天然高分子 (例えば、蛋白質、ポリベンチド若しくは炭水化合物) を指す。実際には、安定化部分は、コロイド粒の表面に結合しては、その機構の簡単には、その表面についた溶解性安定化部分を持つ個の粒子に関して適用できる。この2個の粒子が互いに接近すると、安定化刺激度は、その分離距離の問題として2個の粒子の間で顕著で増加する。これにより、この領域に於ける溶解性部の配列の密度が増加する、これらの出来事は、浸透圧及びエントロピー的観点から好ましくなく、従つて、これらの作用を克服し得る力がないと粒子を合体または会合させる傾向が低下する。構造安定化の有効性を低下させた力の例としては、熱が挙げられ、これにより粒子の動力学エネルギーが増加し、安定化部分を破壊破壊質にそれほど溶解性でないようにできた。ポリエチレンオキシドが水中に懸濁したコロイド粒子に固定した安定化部分がある場合、この一例が生ずる。温度を室温から50〜70℃に上昇すると、安定剤の溶解性は低下し、従つてその有効性も低下する。親和性非-溶解性緩衝液を添加すると、同様の非-安定化効果が得られない。構造安定化は、安定剤の溶解特性に大きく作用しない限り、通常、連続相のイオン強度に敏感でない。立体安定化の原理は、Donald H. Mapper, "Steric Stabilization," *J. Colloid Interface Sci.*, 58, 390, 1977より適切に記載されている。

【0065】コロイド粒子の安定化の第3の機構は、% 乏 (depletion) 安定化である。この方法は、溶解性安

定化部分も使用するが、これらは、コロイド粒子の表面にある必須でない。この種の安定化は、非イオン性ポリマーを分散媒質中に溶解させるだけで実施し得る。これらが非直接接触していると、粒子の表面間の距離がより一層の媒体の空乏から安定化が生じる。この方法は、Robert L. Pelgus及びDonald H. Napper, "Depletion Stabilization and Depletion Flocculation," J. Colloid Interface Sci., 75, 525, 1980に適切に記載されている。

【0066】本発明のコロイドである粒子は、本例で使用するのに最も好ましい。これらのコロイド粒子は、各々の安定化機構によりそれぞれ異なった影響を受ける。例えば、本発明は、構成成分として、ラマン活性媒質に接合するか、または会合する。「染料またはポリマー分子」とも参照される金属コロイドを使用し得る。これらの媒質は、簡単な疎水性吸着または化学吸着により金属につけることができ、これにより、媒質上の特異的な官能基への金属の特異的な化学的相互作用が起きる。金属に対する化学吸着の一例としては、第一配位化学吸着結合を形成する銀表面へのチオール基の相互作用がある。還元条件下で合成した金属コロイドでは、ジスルフィド部分をコロイドに添加可能であり、多くは金属表面で還元されてチオールを形成し、これが金属表面で化学吸着される。アミノ基も、特定の金属表面上に親和性を有し得るが、チオールよりも弱い相互作用であると通常考えられている。媒質を負に帯電した金属コロイドに添加すると、この媒質が反対の電荷の基（例えば、アミノ基）を含んでいて、電荷の中和が起きてコロイドが凝集する。これらの場合、分散媒質に安定剤を添加するのが好ましく、これが粒子に付着して、立体安定化を提供できたり、溶液中で独立したままなので、空乏安定化となり得る。これらの安定化段階は通常、イオン効果に対して感受性ではない。実際、市販の非イオン安定剤（例えば、Tween 20若しくはBrij 35）または天然の安定剤（例えば、アルブミン、γ-グロブリン若しくはγムノグロブリンで特異的な結合成分としても作用し得る）は、ラマン活性媒質または染料の添加前に添加し得る。

【0067】P. K. Aravind, A. Nitzan及びH. MetlinらのSurface Sci., 110, 189, 1981の計算では、短い距離で隔てられている2個の小さな（レイリー）球体に関する励起スベクトル及び局所電界（local field）は、単球としての挙動の明らかな重複とは非常に異なることを示している。新しい共振は単球の場合よりも低い周波数に現れ、球の間の局所電界の二乗は銀の場合、単球よりも一桁は大きい範囲である。H. Metlinの "Surface Enhanced Spectroscopy", Progress in Surface Science, no 1, 17, pp. 153-320, 1984の総説では、その28ページにて、この場合、放射強度は10倍増加すると考えられており、2側の球の間に配置された分子の強化ラマンスベクトルは、単球付近に配置された分子よりも100倍以上であ

たことを記載している。H. Metlinは、粒子の凝集は、コロイド系の気液相平衡の挙動を根本的に変え、1/4世紀理論の検証を必ずしも測定では覆うべきであると指摘している。

【0068】本研究に於いて、特異的結合部位と会合した金属コロイドの表面の近くに配置された、即ちこれに会合したラマン活性媒質のSEERSスベクトルは、その相補的特異的結合部位を添加することにより影響を受けた。従って、以下のラマン活性媒質に於いて記載されているような媒質の電気力学的挙動が、染料媒質のSEERS挙動により検出可能な方法で変化することは推測し得る。これは、コロイド表面で固定化されるその結合部分と被分析物質との相互作用により加減されたコロイド粒子の会合によるものであろう。

【0069】2. SEERS-活性媒質への特異的結合部位の直接吸着、媒介分子若しくはリソカンチウムを介する接合、特異的結合部位への共有結合的接合により、または直接若しくはリソカンチウムを介してSEERS-活性表面上に被覆された特異的結合部位の共有結合的接合により、若しくはリソカンチウムの遊走部分の強化表面への挿入により、SEERS-活性媒質に特異的結合部位を接合し得る。

【0070】3. ラマン活性媒質 ラマン活性媒質は、特有のラマン散乱パターンを有する多くの分子であり、いずれでもよい。例えば、アルブミンで使用する酵素と異なり、これらの媒質は、必要により化学的に修飾し得る安定で、簡易で、安価な分子であり得る。

【0071】以下の特徴は、この適用に於ける媒質の効率を高める。

【0072】(a) レーザー励起波長の近傍にある強い吸収帯（励起係数は 10^4 に近い）であること；

(b) 特異的な結合部位に共有結合し得る官能基であること；

(c) 光安定性であること；

(d) 十分な表面及び共動強化により、サブナノグラム範囲の検出限界を有すること；

(e) 媒質化特異的結合部位と未媒質化特異的結合部位との間の結合相互作用の干渉が最小であること；

(f) 使用した励起波長での強い蛍光放射が最小であること；

(g) 幾つかの強いピークを伴う比較的簡単な散乱パターンであること；及びまたは

(f) 散乱パターンを保持し得ること。

【0073】以上の4-（4）をミソフェニルアミンフェニルアミンで機一ナリウム塩、アルセニル、塩基性ラジカル、シカゴスアルター、ダイセクトレブ81、デスバーノスレブ3、DMA（2-（4-ヒドロキシ

エニルアミン）、安息香酸）、エトリソニンB、トリベンジル、ボソニンS、ボソニンSS、1,5-ジアルカロロ-2,4-ジエトベンゼン、クレニルアロレット及びリジメチルミソベンゼンなどが列挙されるが、これらがラマン活性媒質の可能な候補の総てではない。選択した媒質は、当該特異的結合部位に共有結合的に接合するか、または着目しくは会合し得る。

【0074】4. 励起源 好ましい媒体に於いて、レーザーは励起源として作用する。レーザーは、安価な型（例えば、ヘリウム-ネオンまたはダイオードレーザー）であってもよい。このようなレーザーの使用寿命は50,000時間以上であり得る。

【0075】一態様に於いて、ダイオードレーザーを使用して、IRスベクトルまたは近IRスベクトルで励起し、蛍光干渉を最小とする。使用した励起源は、必ずしも単色光である必要はなく、高強度である必要もない。ランプも使用し得る。

【0076】SEERS効果は、表面の直接照射により、またはアロマゼン-活性媒質の下で導波管から消失（evanescent）波長により励起され得る。

【0077】5. 接合体 数種の異なる接合体を、種々の特性を有する特異的結合部位から製造でき、異なるラマン活性媒質を持つその各々は、別個の散乱パターンを持つ。これらの接合体をアッセイで能合すると、同一サンプル中にある数種の異なる被分析物質を同時に分析できる。

【0078】6. 検出 ラマン散乱を検出するには、数種の方法を使用し得る。これらは通常、種々の平均分光計を用い得る。SEERSに於いて、基本媒質は、特定の波長に於ける光散乱強度を測定するものである。SEERSは、励起ピーム由来の強いバックグラウンドの存在下で、波長がずれた散乱の強度を測定しなくてはならない。ストークスシフトの大きいラマン活性物質を使用すると、この測定が容易である。

【0079】散光媒質をさらに簡易化するための幾つかの概念が提案された。これらの例としては、波長選択的ミラー、フィルムまたは散乱した光を集めるためのホログラム光学素子を使用することも包含する。

【0080】SEERSを使用すると、表面への入射光ピームの角度も検出器の位置も重要ではない。通常は、垂直に於いて60°にレーザーピームが入射する平坦な表面を使用して実施されており、ピームに對して90°か180°での検出が標準である。SEERS励起は、近赤外領域で実施可能であり、これによりサンプル固有の蛍光をカットする。光導波管により得た雨水流を流すSEERS-ベースのリガンド結合アッセイを実施することも可能である。

【0081】照射時に励起波長に開始する中で、サンプルの発生（deposition）時間は必要なく、励起光が非常に強力で化学的変化を引き起こさない限り、サンプルの増延は所望の間、データを収集し得る。サンプルは、光

学吸収に依存する系に於いては重複できない。蛍光散取系と異なり、SEERSポスタームは、「自己-消光（self-quench）」ではないので、サンプルは、アロ分子上のラマンポスターム-基を増加させることでより強化し得る。SEERS-活性表面近くの蛍光分子は、実際に表面-消光される。

【0082】7. 数値構成 本発明は自動分析用に適用できる。本装置は別個のストークス-シフトスベクトル線を制御するので、精巧な消光系の必要はない。光学技術に於ける近年の進歩（例えば、ホログラム光学素子）により、研究室グレードの装置よりも安価なコスト及びより簡素で好適な分光計の設計が可能である。

【0083】SEERSの結果として光学散取エネルギーは、超感受性光光子増強を必要とする。実際、現在使用されている数種のSEERS分光計は、シリコンフォトダイオード検出器を含む。研究室グレードの分光計で用いられている典型的な単色光の光学効率（optical efficiency）は、10%未満である。上記した光学物質及び成分の進歩により、幾つもの特異的なスベクトル線のみを測る簡単な分光器の光学効率を2〜3倍増し得る。これは、先の主要な問題の一つ、レイリー散乱の連続にも則する。10°のオーダーの通電能力の新しいフィルムターを、典型的な単色光系の1段階以上のフィルターの代わりにすると、かなりコストを削減できる。

【0084】8. 分析用装置 クロマトグラフ結合アッセイにより試験サンプル中の被分析物質を分析する通電装置は、従来公知である。例えば、Deutschらは、クロマトグラフ試験ストリップ装置について米国特許第4,094,647号、同第4,235,601号及び同第4,361,537号に記載している。これらの文獻は、本明細書中参照として与えられる。Deutschらの装置に對する変形は、米国特許第4,366,241号及び同第4,186,146号に記載されている。Zukら、"Enzyme Immunoassay Application, A quantitative immunoassay Requiring No Instrumentation," Clin. Chem., 31, 1144, 1985は、アッセイ原理についてさらに記載している。米国特許第4,298,688号、同第4,517,268号、同第4,740,468号及び同第4,366,241号、欧州特許第8,636号、同第2,591,51号及び同第2,607,005号も重要である。

【0085】

【実施例】

【0086】

【実施例1】

顕微鏡の製造 支持基表面一層フィルム用の支持剤は、顕微鏡スライドから切り出した平坦な平で消したガラス片または4インチ×4インチ×20ミルの水晶基材（General Electric Type 120）から切り出した水晶片であった。

【0087】此の例の改造-Mi及びOpticon Anal. Chem.,

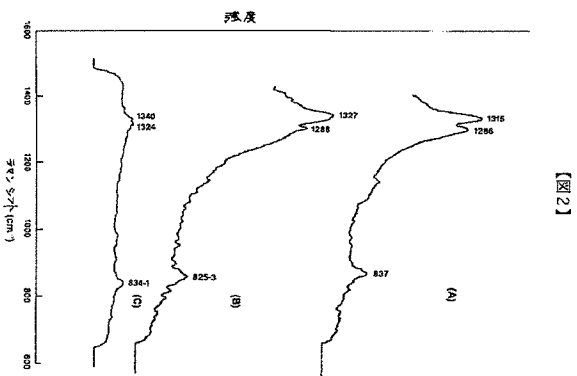
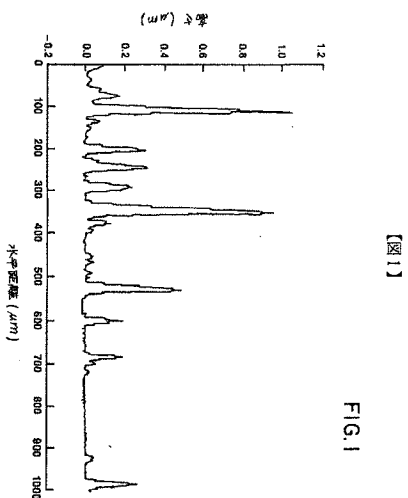


FIG.2

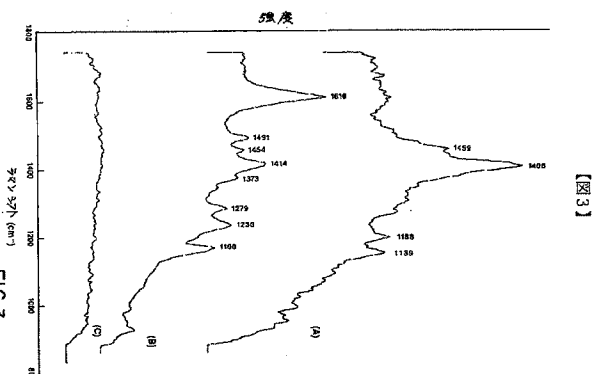


FIG.3

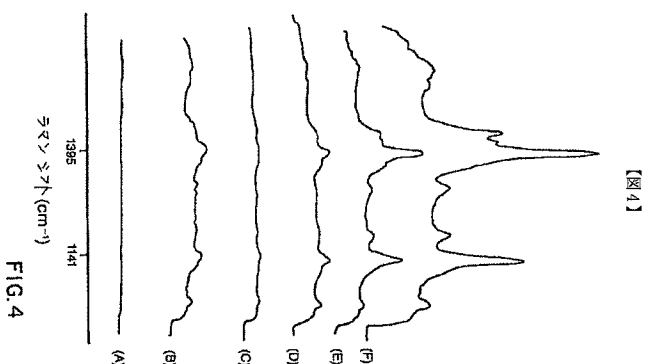


FIG.4

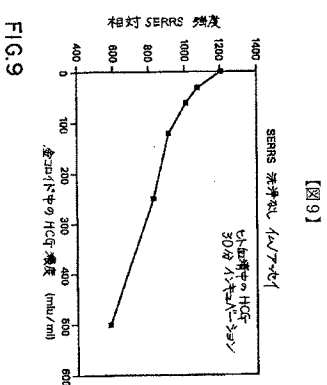


FIG.9

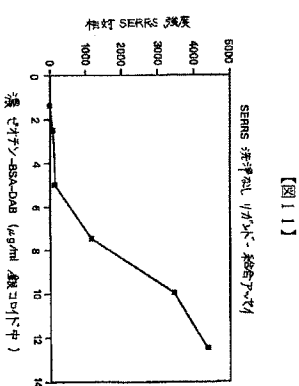
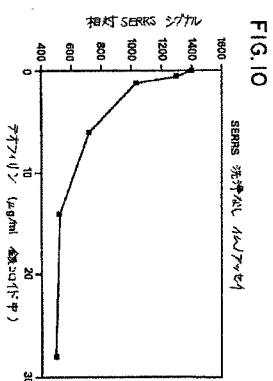
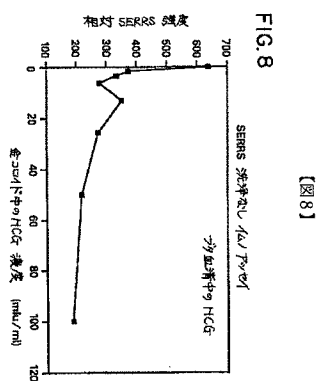


FIG.11

(19)

特開平6-174723

(20)

特開平6-174723

【図5】

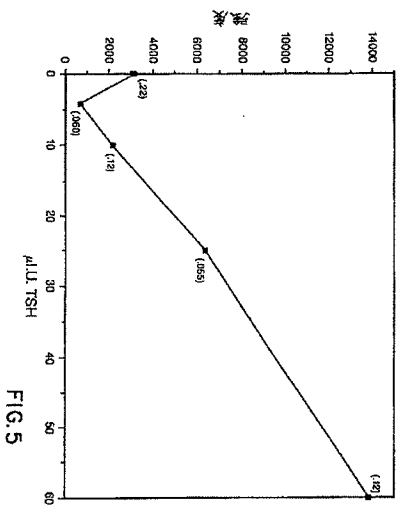


FIG. 5

【図7】

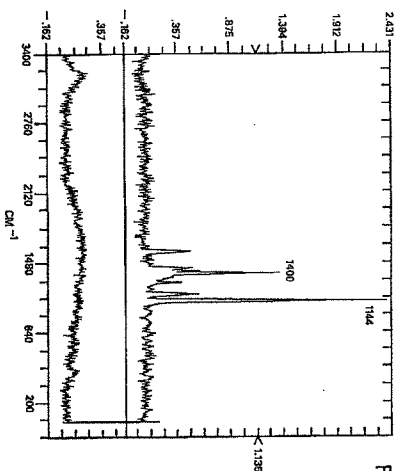


FIG. 7

【図12】

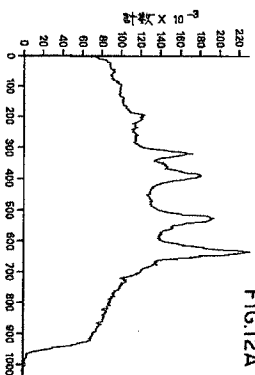


FIG. 12A

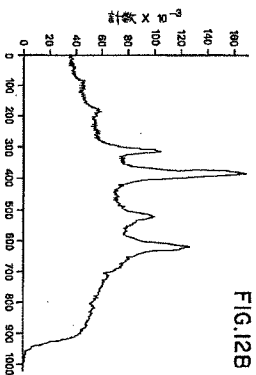


FIG. 12B

【図6】

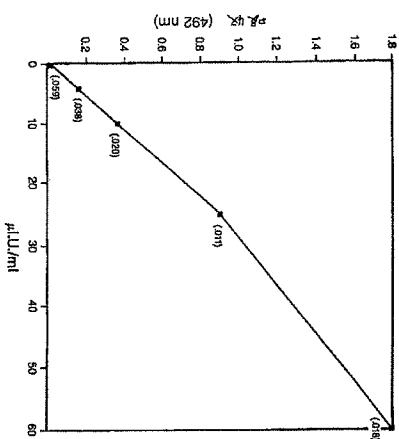


FIG. 6

(21)

特開平6-174723

フロントペーシの続き

(72)発明者
シエイムス・シエイ・マールカス
アメリカ合衆国、イリノイ・60515、ダウ
ナーズ・クロウチ、サッチャー・シツクス
ス・ストリート・550

(72)発明者
テレーゼ・コットソ
アメリカ合衆国、アイオワ・50010、エイ
ムズ、ユタ・ドライヴ・4134
(72)発明者
バーナード・ロスベン・ドウスギ
イギリス国、スコットランド・ジー・32、
9・エル・ジー、グラスコウ、サンディエー
ビルズ、サンディエービルズ・ドドライヴ・20